

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Ludwig - Maximilians - Universität
München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Kampik

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen
der vitreoretinalen Grenzfläche nach
enzymatischer Behandlung

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dominik Eckle
aus Wiesbaden

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Kampik

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas Frick

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. A. Gandorfer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Fragestellung	6
1.2. Klinische Bedeutung	6
1.3. Grundlagen	7
1.3.1. Glaskörperentwicklung und Zusammensetzung	7
1.3.2. Hintere Glaskörperabhebung (PVD)	8
1.3.3. Extrazelluläre Glycoproteine	8
1.3.4. Membrana limitans interna (ILM)	9
1.3.5. Matrix Metalloproteinasen (MMP)	9
1.4. Pathogenese vitreoretinaler Erkrankungen	10
1.4.1. Einführung	10
1.4.2. Idiopathische epiretinale Gliose (ERM)	10
1.4.3. Vitreomakuläres Traktionssyndrom	11
1.4.4. Idiopathisches Makulaforamen	11
1.4.5. Proliferative diabetische Retinopathie (PDR)	12
1.5. Enzyme	13
1.5.1. Grundlagen	13
1.5.2. Spezifische Proteasen	14
1.5.2.1. Hyaluronidase	14
1.5.2.2. Chondroitinase ABC	14
1.5.3. Unspezifische Proteasen	15
1.5.3.1. Dispase	15
1.5.3.2. Plasmin und Mikroplasmin	15
2. Material und Methodik	17

2.1. Material	17
2.1.1. Enzyme.....	17
2.1.2. Schweineaugen.....	17
2.1.3. Lösungsmittel	17
2.2. Methodik	18
2.2.1. Präparateaufbereitung.....	18
2.2.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	18
2.2.3. Auswertung	19
2.3. Einteilung	19
2.3.1. Chondroitinase ABC	20
2.3.2. Dispase	20
2.3.3. Microplasmin	21
2.3.3.1. Microplasmin gelöst in Calcium und Magnesium freier - Phosphat gepufferter Lösung (CMF - PBS)	21
2.3.3.2. Microplasmin gelöst in neutraler Salzlösung - Glucose und Glutathiondisulfid (BSS - Plus).....	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Makroskopische und mikroskopische Befunde.....	23
3.2. Rasterelektronenmikroskopie.....	23
3.2.1. Chondroitinase ABC	23
3.2.2. Dispase	25
3.2.3. Microplasmin	27
3.2.3.1. Microplasmin gelöst in Calcium und Magnesium freier - Phosphat gepufferter Lösung (CMF - PBS)	27
3.2.3.2. Microplasmin gelöst in neutraler Salzlösung - Glucose und Glutathiondisulfid (BSS - Plus).....	29
4. Diskussion	31

5. Zusammenfassung	38
6. Abbildungen	39
7. Literaturverzeichnis	45
Lebenslauf	50
Danksagung	52

1. Einleitung

1.1. Fragestellung

Bei der Entstehung von Netzhauterkrankungen und Komplikationen nach Eingriffen am hinteren Augenabschnitt spielen sowohl der Glaskörper als auch dessen Adhäsionen mit der Netzhaut, insbesondere mit der Membrana limitans interna (Englisch: internal limiting Membrane (ILM)) eine entscheidende Rolle.

Unser Anliegen war es, die Wirkung von intravitreal applizierten Enzymen auf die Ausprägung von Kollagenfibrillen des Glaskörpers an der Membrana limitans interna darzustellen. Dazu untersuchten wir die Netzhautoberfläche von Schweineaugen nach intravitrealer Injektion von spezifischen und unspezifischen Proteasen mittels Rasterelektronenmikroskopie.

1.2. Klinische Bedeutung

Ein wesentlicher Teil der heutigen Augenheilkunde besteht in der operativen Versorgung von Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts.

In der Vergangenheit führte der Einsatz von Substanzen wie leichtem Silikonöl, schwerem Silikonöl (Perfluorohexyloctane/Polydimethylsiloxane = Densiron 68), lang wirksamen Gastamponaden wie z.B. Schwefelhexafluorid (SF_6) und Perfluorethan (C_2F_6) und schwere Flüssigkeit (Perfluorodecalin = F-Decalin (PFCL)) zu einer Verbesserung der operativen Ergebnisse. Doch der Wunsch nach weiteren Substanzen mit dem Ziel der Verbesserung der operativen Ergebnisse und der Prognose ist ungebrochen.

Dabei besteht ein besonderes Interesse an der enzymatischen Verflüssigung des Glaskörpers und an der Induktion einer hinteren Glaskörperabhebung durch minimal invasive Therapie. Hier stellt die enzymatische Behandlung bis heute noch eine sich in der Entwicklung befindende Methode dar.

Derzeit wird durch die Eingabe von Gewebeplasminogenaktivator eine subretinale Blutung lysiert und mittels eines injizierten Gases aus dem Makulabereich mechanisch verdrängt.

Weitere Einsatzmöglichkeiten bestehen heute nur in der Theorie oder in der Entwicklungs- bzw. in der Erprobungsphase. Hierdurch könnte es in der Zukunft zu einem Wandel des

therapeutischen und operativen Vorgehens im Rahmen der Versorgung von Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts kommen. Heute besteht das operative Vorgehen aus der mechanischen Lösung des Glaskörpers von der Netzhaut, was jedoch meist nicht vollständig gelingt.[48]

Erste klinische Erfahrungen mit der enzymatischen Methode zeigen, dass die vollständige Entfernung der Glaskörperrinde für den Erfolg der Operation und für die Prognose von entscheidender Bedeutung ist.[7,44,48]

1.3. Grundlagen

1.3.1. Glaskörperentwicklung und Zusammensetzung

In der Embryonalphase konnte nachgewiesen werden, dass Chondroitin-6-sulfat und Chondroitin-4-sulfat die am häufigsten vorkommenden Glycosaminoglycane im Glaskörper neben Hyaluronsäure darstellen. Von der fünften bis zwölften Woche und ab der vierzigsten Woche ist Hyaluronsäure das am häufigsten verbreitete Glycosaminoglycan.[6] Diese Substanzen sind sowohl im Glaskörper als auch im extraokulären Bereich, zwischen der zwölften bis vierzigsten Woche zusätzlich an der Retina und der Arteria hyaloidea nachweisbar.

Kollagen Typ III kann hingegen nur im Glaskörper und im Bereich mesenchymaler Zellen von der fünften bis siebten Woche nachgewiesen werden und wird durch Kollagen Typ II nach der achten Woche ersetzt.[6]

Nach Abschluss der Glaskörperentwicklung besteht dieser zu 99% aus Wasser, zu 0.9% aus niedermolekularen und zu 0.1% aus hochmolekularen Substanzen wie z.B. Hyaluronsäure, Kollagen Typ II und anderen Proteinen.[3]

Er erhält seine gelartige Konsistenz sowie transparente und dämpfende Eigenschaft durch die dreidimensionale Vernetzung von Kollagenfasern, stabilisiert durch Hyaluronsäuremoleküle. Durch Alterungsprozesse kommt es zum Kollaps der dreidimensionalen Glaskörperstruktur. Dieser wird durch eine partielle Depolymerisation von Hyaluronsäure hervorgerufen, was sich als zunehmende Glaskörperverflüssigung nachweisen lässt.[3,45]

Dieser Prozess ist mit fortschreitendem Alter vermehrt mit einer hinteren Glaskörperabhebung assoziiert.[9]

1.3.2. Hintere Glaskörperabhebung (PVD)

Die Glaskörperrinde hat an der Netzhaut einige natürliche Anheftungsstellen. Diese befinden sich zum einen an der Glaskörperbasis (Ora serrata) und zum anderen am hinteren Augenabschnitt im Bereich des Sehnervenkopfes (Papilla nervi optici), des gelben Flecks (Makula), sowie entlang der großen Gefäßarkaden und an einigen weiteren unspezifischen Netzhautstellen.

Die Verflüssigung des Glaskörpers (Synchisis), wie auch die Häufigkeit einer hinteren Glaskörperabhebung (Syneresis), nimmt statistisch mit dem Alter zu, da ein enger Zusammenhang zwischen der Verflüssigung des Glaskörpers und der Entstehung einer hinteren Glaskörperabhebung besteht. Der Glaskörper toleriert nur einen gewissen Grad an Verflüssigung, dann bilden sich intravitreale Kavernen aus. Wird ein kritisches Maß überschritten, so wird der Glaskörper instabil und kollabiert, wodurch es zu einer hinteren Glaskörperabhebung kommt.[9]

Bisweilen liegt am zu operierenden Auge schon eine partielle oder vollständige hintere Glaskörperabhebung vor. Ist dies nicht der Fall, so wird diese intraoperativ induziert.[50] Dies ist für den operativen Erfolg einer Vitrektomie von entscheidender Bedeutung, da nur so bestehende vitreoretinale Traktionen, die bei einer Vielzahl von Netzhauterkrankungen vorhanden sind, gelöst werden können. [4,29]

1.3.3. Extrazelluläre Glycoproteine

Betrachtet man die vitreoretinalen Anheftungen, so konnten bisher zwei extrazelluläre Glycoproteine nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um Fibronectin und Laminin. Diese vermitteln die Verknüpfung von Zellen mit der extrazellulären Matrix.

Fibronectin wurde auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zelltypen und extrazellulären Matrices nachgewiesen. Es bindet mit einer hohen Affinität an Kollagen II, Hyaluronsäure, Proteoglycane und mesenchymale Zellen. Laminin bindet bevorzugt an Kollagen Typ IV, eine Komponente von Basalmembranen.[35]

Die Anwesenheit von Fibronectin und Laminin in der ILM deutet darauf hin, dass diese Glykoproteine eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Anheftungen des Glaskörpers an der ILM spielen.[35,51]

1.3.4. Membrana limitans interna (ILM)

Die ILM stellt die innere Basalmembran der Netzhaut dar und ist zwischen den Müllerschen - Stützzellen und der Glaskörperrinde lokalisiert.[20] Sie besteht aus einem dreischichtigen Aufbau (Lamina rara interna (Lamina lucida), Lamina densa, und Lamina rara externa) und ist abhängig von der Netzhautregion in ihrem Schichtaufbau variabel.[22,23,24,40] Eingebettet sind Proteoglycane, Fibronectin, Laminin und Kollagenfasern vom Typ I und Typ IV.[35,43] Die Lamina rara externa stellt die Struktur dar, an welcher die vitreoretinalen Adhäsionen ansetzen. Kollagenfasern der Glaskörperrinde vom Typ II verlaufen parallel zu der Oberfläche der ILM, so dass Brücken zwischen Kollagenfasern untereinander und mit der ILM entstehen können.[45] Es wird vermutet, dass die vitreoretinalen Adhäsionen durch eine extrazelluläre Matrix („glue“, evtl. Laminin, Fibronectin) zwischen Kollagenfasern des Glaskörpers und der Oberfläche der ILM bedingt sind.[42] Im Bereich der Glaskörperbasis ziehen die Kollagenfasern des Glaskörpers hingegen senkrecht zur Ora Serrata.[8,45] In diesem Bereich ist die Lamina densa dünner. Die Dicke der ILM beträgt in der Peripherie ca. 260nm, zum hinteren Pol hin nimmt sie deutlich an Dicke zu und beträgt bis zu 2500nm. Im Bereich der Fovea, wie auch an der Papille, ist die ILM sehr dünn (ca. 20nm-30nm).[8,22,23,31,40]

Es kann abhängig von der Lokalisation sowie vom Alter des Auges, eine unterschiedliche Verteilung von Glycoproteinen im Bereich der ILM und der Glaskörperrinde nachgewiesen werden. Im Bereich der Ora serrata werden nur geringe Mengen von Fibronectin nachgewiesen.[35] Mit zunehmendem Alter steigt die Menge von Fibronectin im Bereich der äquatorialen ILM an, während am hinteren Pol der ILM schon an juvenilen Augen viel Fibronectin und Laminin nachgewiesen werden kann. Eine zweischichtige Anordnung war in allen Altersklassen nur am hinteren Pol der ILM darstellbar.[35]

1.3.5. Matrix Metalloproteinasen (MMP)

Es lassen sich eine Vielzahl von Matrix Metallproteinasen intraokular nachweisen. Im Bereich der Retina lassen sich nur MMP vom Typ 1,2,3 und 9 darstellen. Sie gehören zu der Familie der proteolytischen Enzyme. Ebenso sind bis jetzt vier Inhibitoren (TIMPs =tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) bekannt. Diese hemmen die Wirkung der MMPs.[46]

MMPs vom Typ 2 (Gelatinase A) und Typ 9 (Gelatinase B) spalten Kollagen Typ IV und Laminin.[46] Sie werden mitunter von Müller-Glia-Zellen gebildet.[38] Bei klinisch signifikantem Makulaödem sind sie nachweisbar und erhöhen die Gefäßpermeabilität durch ihre proteolytische Wirkung an tight junctions der Gefäßendothelzellen.[16] Ebenso lassen sich erhöhte Konzentrationen im subretinalen Raum während einer Netzhautablösung nachweisen.[17] MMP Typ 1 ist eine Kollagenase. Sie spalten fibrilläres natives Kollagen des Typs I, II und III. Es konnte weiter MMP Typ 3 mit Stromelysinwirkung an der Retina nachgewiesen werden. Dieses spaltet verschiedene Kollagen Typen sowie Proteoglykane und aktiviert weitere MMPs.[46]

1.4. Pathogenese vitreoretinaler Erkrankungen

1.4.1. Einführung

Dargestellt werden die epiretinale Gliose, das idiopathische vitreomakuläre Traktionssyndrom, das idiopathische Makulaforamen sowie die proliferative diabetische Retinopathie.[12,25,47,48]

1.4.2. Idiopathische epiretinale Gliose (ERM)

Es handelt sich um die Proliferation von Zellen auf der Netzhautoberfläche. Man erkennt klinisch eine dünne, perlmuttfarbene, immobile Oberfläche bisweilen auch mit einem Makulaödem und vereinzelt zystischen Veränderungen. In ca. 14% ist ein sogenanntes Pseudofoamen nachweisbar.[5] Die exakte Rolle einer hinteren Glaskörperabhebung bei der Entstehung einer epiretinalen Membran ist noch unklar. Einige Autoren berichten, dass 60% bis 100% der idiopathischen epiretinalen Gliosen in Anwesenheit einer hinteren Glaskörperabhebung entstehen.[25] Hierbei wird die Proliferation von Gliazellen und retinalen Pigmentepithelzellen[32,47] angenommen, die durch Brüche in der ILM auf die Oberfläche der Netzhaut gelangen. Es wird postuliert, dass diese Brüche durch eine hintere Glaskörperabhebung induziert werden. Andere Autoren beschrieben vereinzelt epiretinale Gliosen in Abwesenheit einer hinteren Glaskörperabhebung.[25]

1.4.3. Vitreomakuläres Traktionssyndrom

Die klinischen und histopathologischen Merkmale ähneln denen einer idiopathischen epiretinalen Membran. Ein vitreomakuläres Traktionssyndrom tritt wie bei einer epiretinalen Membran auch durch Reduktion der Sehschärfe, Metamorphopsien, Mikropsien und Photopsien in Erscheinung. Zumeist zeigt sich eine Glaskörperabhebung peripher einer Zone, welche Papille und Makula einschließt und in welcher der Glaskörper anheftet.[12] Die Durchführung einer Vitrektomie hat gezeigt, dass die Traktion im Bereich der Makula gelöst und ein Visusanstieg in den meisten Fällen erreicht werden kann.[12] Es konnten verschiedene vitreomakuläre Pathologien bei vitreomakulären Traktionssyndromen nachgewiesen werden. Bei einem Typ konnten vereinzelt Zellen oder ein einschichtiger Membrantyp auf der vitrealen Fläche der ILM nachgewiesen werden. Dieser war biomikroskopisch transparent. Eine Verziehung (surface wrinkling) des vitreoretinalen Interfaces war nicht erkennbar. Ein weiterer Membrantyp bestand aus mehrschichtigem fibrozellulärem Gewebe zumeist Myofibroblasten, welcher von der ILM durch eine Schicht Kollagenfasern, der Glaskörperrinde abstammend, getrennt war. Diese Membran war präoperativ und intraoperativ biomikroskopisch erkennbar.[12,39] Sie besitzt ähnliche Eigenschaften wie die Membran in idiopathischen epiretinalen Membranen bei hinterer Glaskörperabhebung.[12] Letztendlich ist der Mechanismus, der zu vitreomakulärer Traktion und zu fibrozellulärer Proliferation führt, nicht geklärt. Jedoch scheint eine anterograde und/oder tangential Traktion im Bereich der Makula für die Pathogenese des vitreoretinalen Traktionssyndroms von entscheidender Bedeutung zu sein.[12,25]

1.4.4. Idiopathisches Makulaforamen

Hierbei handelt es sich um ein durch alle Schichten der Retina reichendes Loch im Bereich der Fovea. Die Einteilung erfolgt nach Gass und beschreibt vier Stadien.[15,30] Im Stadium eins ist eine intraretinale zystische Veränderung nachweisbar. Die foveale Depression ist verstrichen. Diese Veränderungen sind mikroskopisch teils als gelbliche Verfärbung im Bereich der Fovea zu erkennen. Das Stadium zwei, auch als frühes durchgreifendes Makulaforamen bezeichnet, zeichnet sich durch Traktionen des präfovealen Glaskörpers aus. Es ist ein zumeist exzentrischer sichelartiger Netzhautdefekt, welcher kleiner als 400µm ist, nachweisbar. Vereinzelt sind präfoveale Trübungen (Pseudo-Operkulum) zu erkennen. Im

Stadium drei liegt ein durchgreifendes Makulaforamen vor. Es zieht durch alle Netzhautschichten. Hierbei besteht ein runder Netzhautdefekt, welcher größer als 400µm ist. Die Ränder des Loches sind typischerweise zystisch verändert und abgehoben, die sensorische Netzhaut verdickt. Die hintere Glaskörpergrenzmembran ist anliegend und vereinzelt sind präfoveale Trübungen (Pseudo-Operkulum) nachweisbar. Das Stadium vier nach Gass ist durch eine Vergrößerung des Defektes charakterisiert. Die Ränder des Loches sind eleviert und vereinzelt sind gelbliche Ablagerungen am Grund des Foramens zu erkennen. Der hintere Glaskörper ist abgehoben, ein Operkulum ist in einigen Fällen über dem Loch an der hinteren Glaskörpergrenzmembran darstellbar. Es bestehen Sehverschlechterung, Metamorphopsien und zentrale Gesichtsfelddefekte.[15,30]

Der Entstehungsmechanismus wird kontrovers diskutiert. Da bei einigen Untersuchungen in 88 bis 100% der Makulaforamen eine hintere Glaskörperabhebung festgestellt wurde, nehmen einige Wissenschaftler an, dass der Entstehungsmechanismus entscheidend mit der hinteren Glaskörperabhebung im Zusammenhang steht.[2]

Andere Wissenschaftler, welche hintere Glaskörperabhebungen in nur 12% bzw. 48% der Patienten mit Makulaforamen feststellten, nehmen hingegen an, dass eine nach anterior oder tangential gerichtete Kontraktion im prämakulären Bereich für die Entstehung verantwortlich ist.[2]

Das Risiko, dass sich ein Makulaforamen nach vollständiger hinterer Glaskörperabhebung entwickelt ist sehr gering.[4] Durch die operative Versorgung von Frühstadien eines Makulaforamens mittels Induktion einer hinteren Glaskörperabhebung und Lösung von vitreofovealen Traktionen, wurde die Entwicklung eines durchgreifenden Makulaforamens verhindert.[4] Bei einem bestehenden durchgreifenden Makulaforamen kann eine Verbesserung der Sehschärfe und eine deutliche Reduktion der Metamorphopsien mittels operativer Versorgung durch eine hintere Glaskörperabhebung und Entfernung aller Traktionen erzielt werden.[34]

1.4.5. Proliferative diabetische Retinopathie (PDR)

Es handelt sich um fortgeschrittene retinale Veränderungen im Rahmen eines Diabetes mellitus, welche sich als Gefäßneubildungen im Bereich der Papille und/oder der peripheren Netzhaut mit oder ohne Glaskörperblutung darstellen. Ursächlich hierfür ist eine retinale Ischämie. Bei fortschreitender Glaskörperabhebung zieht der Glaskörper die neu gebildeten

Gefäße in den Glaskörperraum, wodurch Glaskörperhämorrhagien und traktive rhegmatogene Netzhautablösungen verursacht werden können.[29] Dies kann auch nach durchgeführter panretinaler Laserkoagulation bei inkompletter Glaskörperabhebung der Fall sein.[29] Hier nimmt zumeist die Traktion induziert durch eine verstärkte Glaskörperabhebung zu, was häufig eine anschließende Vitrektomie erforderlich macht. Es konnte gezeigt werden, dass eine vollständige hintere Glaskörperabhebung, altersbedingt oder operativ[36] hervorgerufen, einen protektiven Einfluss auf die Gefäßproliferation hat, da die Oberfläche der hinteren Glaskörperrinde bei fehlender oder nur partieller Glaskörperabhebung eine für die Proliferation bahnende Struktur darstellt.[1,29,31]

Die ILM kann bei diabetischer Makulopathie verdickt sein. Als Ursache hierfür wird ein Anstieg der extrazellulären Matrix Komponenten (Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ I, III, IV und V) sowie zellulärer Komponenten verantwortlich gemacht.[14,41]

1.5. Enzyme

1.5.1. Grundlagen

Die verwendeten Enzyme sollen ein Kollabieren des Glaskörpers durch eine Glaskörperverflüssigung (Synchisis) bei gleichzeitiger hinterer Glaskörperabhebung (Syneresis) hervorrufen. Dies wird als pharmakologische Vitreolyse bezeichnet.[44] Tritt nur eine Synchisis ohne Syneresis auf, kann dies Komplikationen, wie bei einigen vitreoretinalen Erkrankungen im Spontanverlauf bekannt, hervorrufen. Hierzu gehört die traktive Makulopathie, das Makulaforamen sowie das Netzhautforamen, welche durch eine Synchisis bei bestehen bleibenden Glaskörperanheftungen verursacht werden.

Synchisis und Syneresis sollen durch den Einsatz von Enzymen induziert werden. Dabei wurden in den bisherigen Untersuchungen Hyaluronidase, Dispase, Gewebeplasminogen-aktivator, Chondroitinase ABC und Plasmin herangezogen.

Hierbei stellen Plasmin und Dispase unspezifische, Chondroitinase ABC und Hyaluronidase spezifische Proteasen dar.[44,48,51] Sie entwickeln ihre enzymatische Aktivität gegenüber Glycosaminoglycanen. Dispase wirkt an Fibronectin und an Kollagen Typ IV. Plasmin wirkt auf Fibronectin und Laminin, welche Komponenten des vitreoretinalen Zwischenraums darstellen. Kollagen Typ IV spaltende Eigenschaften wurden bisher bei Plasmin nicht nachgewiesen.[51]

Die Morphologie der ILM soll durch den Einsatz von Enzymen an der ILM möglichst unbeeinflusst bleiben. Jedoch können Proteasen durch ihre Wirkung zu strukturellen Veränderungen der ILM sowie der Netzhaut führen, so auch beim Einsatz der Pronase, einer unspezifischen Protease. Hier konnte eine Destruktion der ILM, sowie deutliche Veränderungen der Retina und ihrer Photorezeptoren nachgewiesen werden. Ebenso bei der Kollagenase, bei welcher oberflächliche retinale Veränderungen nachgewiesen werden konnten.[7,22]

1.5.2. Spezifische Proteasen

1.5.2.1. Hyaluronidase

Hyaluronidase stellt eine spezifische Protease dar, welche Hyaluronsäure an der C1 Bindung der Glycosamin-Gruppe spaltet. Dadurch wird eine Abnahme der Viskosität des Glaskörpers und daraus resultierend eine Glaskörperverschüttung erreicht.[21,22,27] Die Hyaluronidase induziert jedoch keine hintere Glaskörperabhebung.[27] Im Rahmen einer Tierstudie wurden keine morphologischen und histopathologischen Veränderungen der Retina bis zu einer untersuchten Maximaldosis von 150IU Hyaluronidase (ACS-005) festgestellt. Es zeigte sich bei der Fluoreszenzangiographie bei der untersuchten Maximaldosis von 150IU sieben Tage nach Applikation ein unspezifischer Austritt von Fluoreszein entlang der Gefäße.[33]

1.5.2.2. Chondroitinase ABC

Chondroitinsulfat ist wie Hyaluronsäure ein Glycosaminoglycan, jedoch im Glaskörper nur in geringer Menge nachweisbar, da primär während der Embryonalentwicklung in der 6 bis 40 Schwangerschaftswoche vorhanden.[6,22] Chondroitinsulfat hat eine Größe von 240kDa und spielt eine Rolle im Bereich der vitreoretinalen Grenzfläche. Chondroitinase ist eine substratspezifische Protease und greift am Chondroitinsulfat an. Man konnte zeigen, dass nach Applikation von 20 - 10.000IU/ml eine Abhebung des Glaskörpers, sowohl am hinteren Pol wie auch an der Glaskörperbasis und an der Linsenrückfläche am Affenauge induziert wurde.[19] Die ILM war morphologisch unverändert. Im Elektroretinogramm zeigten sich gegenüber einer Kontrollgruppe keine Veränderungen der Latenzen sowie der Amplituden.[19] Auf der Oberfläche der ILM war ein feines Netzwerk aus Kollagenfasern

nachweisbar. Andere Wissenschaftler konnten keine hintere Glaskörperabhebung nach Injektion von Chondroitinase in Schweineaugen nachweisen.[26]

1.5.3. Unspezifische Proteasen

1.5.3.1. Dispase

Dispase ist eine 35.9kDa schwere Protease und spaltet Kollagen Typ IV sowie Fibronectin, wohingegen keine Wirkung an Laminin und Kollagen Typ V und Typ VII besteht.[48] In Gegenwart von Serum wird Dispase nicht deaktiviert, sondern behält ihre enzymatische Aktivität bei. Eine Konzentration von mehr als 0.1U/ml Dispase erzeugte in mehr als 90% der untersuchten Schweineaugen und humanen post-mortem Augen nach 120 Minuten eine partielle oder vollständige hintere Glaskörperabhebung bei fehlender Glaskörperverschüttung.[48] In der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) waren keine Kollagenfibrillen des Glaskörpers an der ILM mehr nachweisbar, jedoch fehlte die Lamina rara externa der ILM und die Lamina densa war nur noch als amorphe granuläre Schicht darstellbar.[48] In anderen Untersuchungen zeigten sich an Schweineaugen keine strukturellen Veränderungen im Aufbau der ILM nach Gabe von 50µg Dispase.[42] Im Rahmen einer weiteren Studie wurde an Mäuseaugen ein erhöhtes Risiko von intravitrealen Hämorrhagien nach Gabe von Dispase nachgewiesen.[49]

1.5.3.2. Plasmin und Mikroplasmin

Humanes Plasmin, eine unspezifische Protease, spaltet eine Vielzahl von Glycoproteinen, unter anderem Fibronectin und Laminin.[37] In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass porcines Plasmin eine vollständige Spaltung der vitreoretinalen Verbindungen im Bereich des hinteren Pols und des Äquators hervorruft, nicht jedoch im Bereich der Glaskörperbasis.[10,11] Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Plasmin nicht durch eine sekundäre Aktivierung von Kollagenasen die Spaltung der vitreoretinalen Verbindungen hervorruft.[10,11] Weiter konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration des Enzyms und der Inkubationszeit in Bezug auf den Umfang der vitreoretinalen Separation nachgewiesen werden.[11] Dieses wurde ebenfalls an Kaninchen nach zusätzlicher Eingabe

von Schwefelhexafluorid-Gas (SF_6) nachgewiesen.[28] Eine morphologische Veränderung der ILM konnte bis zu der getesteten Maximaldosis von 2IU Plasmin bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten nicht nachgewiesen werden.[10] Nach Gabe von humanem Plasmin ist im Elektroretinogramm eine Abnahme der Amplitude der b-Welle zu registrieren, welche sich im zeitlichen Verlauf wieder normalisiert. Es wird die erhöhte Osmolarität der humanen Plasminlösung für diese Veränderung verantwortlich gemacht.[51] Ebenso konnten vereinzelt hintere Linsentrübungen nach Gabe von porcinem (0.18IU) oder humanem (1,3IU) Plasmin nachgewiesen werden.[26]

Die Wirkung von humanem Plasmin nimmt über die Zeit ab und ist nach 24 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze.[51]

Rekombinantes Microplasmin, ein in seiner Ultrastruktur verändertes Plasmin, enthält die enzymatisch wirksamen Proteinstrukturen von Plasmin und besitzt dessen Eigenschaften. Das Molekulargewicht von Microplasmin ist mit 28kDa niedriger als das von Plasmin mit 88kDa.[13]

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Enzyme

Im Rahmen der Untersuchung wurden drei Enzyme eingesetzt.

1. Chondroitinase ABC von *Proteus vulgaris* in einer Konzentration von 0,3-3 IU/mg Salz (Sigma-Aldrich Prod.-Nr.C2905)
2. Dispase (Protease) von *Bacillus polymyxa* in einer Konzentration von 0,4IU/mg Salz (Sigma-Aldrich Prod.-Nr.P3417)
3. Rekombinantes Microplasmin 62,5µg (ThromboGenics Ltd., Dublin, Irland)

2.1.2. Schweineaugen

Die Augen von erwachsenen Schweinen wurden am lokalen Schlachthof unmittelbar nach der Tötung und vor der Überbrühung der Schweine paarweise entnommen. Es wurden Schweineaugen verwendet, da sie in vorangegangenen Untersuchungen eine dichte Glaskörperrinde mit starken Anheftungen an der ILM zeigten.[18]

2.1.3. Lösungsmittel

Für die Untersuchung wurde Calcium und Magnesium freie - Phosphat gepufferte Lösung (CMF - PBS) sowohl als Lösungsmittel der Salze als auch zur Volumensubstitution zur Kontrolle am Partnerauge verwendet. In einer weiteren Serie wurde neutrale Salzlösung - Glucose und Glutathiondifulfid (BSS - Plus) als Lösungsmittel der Salze und für das Partnerauge zur Volumensubstitution verwendet.

2.2. Methodik

2.2.1. Präparateaufbereitung

Die enukleierten Schweineaugen wurden auf Eis gelagert und sofort ins Labor transportiert, von umgebendem Gewebe freipräpariert und im Inkubator bei 37°C für 15 Minuten erwärmt. Es wurde jeweils 0,2ml der zu untersuchenden Substanz über eine Injektion im Bereich der Pars plana des Ziliarkörpers in das Zentrum des Glaskörperaumes unter Sichtkontrolle appliziert. Das zu verabreichende Enzym wurde entweder in CMF - PBS oder in BSS - Plus gelöst und anschließend so aufbereitet, dass die zu applizierende Konzentration in 0,2ml des Lösungsmittels vorlag. In das Partnerauge wurde die gleiche Menge an nativem Lösungsmittel als Kontrolle appliziert. Die so präparierten Augen wurden für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde den Augen jeweils 0,2ml Formaldehyd 4% über die Pars plana verabreicht um eine schnelle und sichere Enzyminaktivierung zu erreichen. Dann wurden die Augen für 24 Stunden in Formaldehyd 10% gelagert.

Jedes Auge wurde mittels dreier Sklerotomien zerteilt. Die erste Sklerotomie erfolgte limbusparallel, anterior des Äquators. Am posterioren Präparat wurden die zwei weiteren Sklerotomien in anteriorer - posteriorer Richtung durchgeführt, so dass drei nahezu gleichbreite Schnittpräparate entstanden. Hieraus wurden zwei Stanzbiopsien der Netzhaut (Durchmesser 6mm) mit einem Hornhauttrepan gewonnen, eine aus dem Bereich des hinteren Pols vom zentralen Schnittpräparat, die andere äquartornah aus einem der beiden peripheren Schnittpräparate. Diese Stanzen wurden bis zur weiteren Aufbereitung in Formaldehyd 10% konserviert.

In einer gesondert durchgeführten Untersuchung wurde die entsprechende Menge Microplasmin in 0,2ml BSS - Plus gelöst und injiziert. In das Kontrollauge wurde 0,2ml natives BSS - Plus appliziert. Der sonstige Versuchsaufbau entsprach dem zuvor beschriebenen.

2.2.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Um die Netzhautstanzen im Rasterelektronenmikroskop zu untersuchen, wurden sie in einer Alkoholreihe mit Konzentrationen von 30%, 50%, 70%, 80%, 95% und 100% aufsteigend

behandelt. Jede Alkoholstufe wurde zweimal für jeweils 15 Minuten durchlaufen, so dass das 10%ige Formaldehyd vollständig ausgewaschen wurde. Nachdem die Präparate in reinem Alkohol vorlagen, wurden sie kritisch punktgetrocknet. Dies geschah unter erhöhtem Druck und CO₂ Eingabe. Hierzu wurde das CPD 030 (Balzer, Lichtenstein) verwendet. Die getrockneten Proben wurden auf selbstklebenden Trägern fixiert und in einem weiteren Schritt durch eine „Bespatterung“ (Polaron, Großbritannien) mit einer 30nm dicken Goldschicht bedampft. So vorbereitet konnten sie im Rasterelektronenmikroskop JSM-35 CF (Jeol, Japan) untersucht werden. Bei einem Vakuum von 10⁻⁵mbar wurden die Oberflächen in verschiedenen Vergrößerungen betrachtet. Zur Auswertung der einzelnen Proben wurden diese in den Vergrößerungen 200-fach, 1000-fach und 3600-fach auf Fotos dokumentiert. Hierfür stand der Fotoapparat Mamiya 6x7 (Mamiya, Japan) mit FP4 Plus (Ilford, USA) Filmen zur Verfügung.

2.2.3. Auswertung

Die Auswertung wurde nach Entwicklung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen vorgenommen. Es wurde die Beschaffenheit der Netzhautoberfläche beurteilt.

Die Einteilung erfolgte nach der Anzahl der noch an der ILM anheftenden Kollagenfibrillen oder Glaskörperresten. Die Präparate wurden in vier Kategorien eingeteilt: Dreifach positiv (+++) bedeutete ein Aufliegen des Glaskörpers auf der Retina oder ein kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen. Zweifach positiv (++) bedeutete ein nicht kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen auf der Oberfläche der ILM. Bei einfach positiv (+) waren nur noch vereinzelte Kollagenfibrillen auf der ILM erkennbar. Bei der Kategorie einfach negativ (-) war eine glatte ILM ohne Kollagenfibrillen oder Glaskörperresten nachweisbar.

2.3. Einteilung

Die Einteilung der Präparate erfolgte nach verwendetem Enzym (Chondroitinase ABC, Dispase und Microplasmin), der applizierten Enzymkonzentration, sowie verwendetem Lösungsmittel (CMF - PBS oder BSS - Plus). Das Partnerauge wurde immer mit dem entsprechenden nativen Lösungsmittel entweder CMF - PBS oder BSS - Plus, ebenfalls 0,2ml, behandelt. Dieses stellte die Kontrollgruppe dar.

2.3.1. Chondroitinase ABC

Das als Salz vorliegende Enzym Chondroitinase ABC von *Proteus vulgaris* 0,3-3IU/mg Salz (Sigma-Aldrich Prod.-Nr.C2905) wurde zur Untersuchung in CMF - PBS gelöst und so verdünnt, dass zwei Enzymkonzentrationen entstanden. Zum einen 1Unit pro 0,2ml und 5Units pro 0,2ml.

Es wurden jeweils drei Augen mit der jeweiligen Enzymkonzentration injiziert. Das Partnerauge erhielt natives CMF - PBS. [Tab.1]

Tabelle 1: Applizierte Konzentration von Chondroitinase ABC in CMF - PBS gelöst

Anzahl der Augenpaare	Enzymkonzentration von Chondroitinase ABC	Lösungsmittel
3	1 Unit	CMF - PBS
3	5 Units	CMF - PBS

2.3.2. Dispase

Dispase (Protease) von *Bacillus polymyxa* in einer Konzentration von 0,4IU/mg Salz (Sigma-Aldrich Prod.-Nr.P3417) wurde ebenfalls in CMF - PBS gelöst und so verdünnt, dass zwei Konzentrationen vorlagen. So wurden 1Unit pro 0,2ml und 5Units pro 0,2ml hergestellt. Jeweils drei Augen wurden mit der entsprechenden Konzentration injiziert. Das Partnerauge erhielt 0,2ml CMF - PBS. [Tab. 2]

Tabelle 2: Applizierte Konzentrationen von Dispase in CMF - PBS gelöst

Anzahl der Augenpaare	Enzymkonzentration von Dispase	Lösungsmittel
3	1 Unit	CMF - PBS
3	5 Units	CMF - PBS

2.3.3. Microplasmin

Bei dieser Untersuchungsreihe verwendeten wir zwei verschiedene Lösungsmittel für das Enzym. Zum einen CMF - PBS und zum anderen BSS - Plus. In das Kontrollauge wurde jeweils nur das native Lösungsmittel injiziert.

2.3.3.1. Microplasmin gelöst in Calcium und Magnesium freier - Phosphat gepufferter Lösung (CMF - PBS)

Das Microplasmin wurde in CMF - PBS gelöst und verdünnt. Es wurde jeweils in drei Augen zu 62,5µg (1Unit), 125µg (2Units), 187,5µg (3Units) und 250µg (4Units) injiziert. Die Partneraugen erhielten jeweils 0,2ml vom nativen CMF - PBS. [Tab. 3]

Tabelle 3: Applizierte Dosis von Microplasmin in CMF - PBS gelöst

Anzahl der Augenpaare	Dosis von Microplasmin (µg)	Lösungsmittel
3	62,5	CMF - PBS
3	125	CMF - PBS
3	187,5	CMF - PBS
3	250	CMF - PBS

2.3.3.2. Microplasmin gelöst in neuraler Salzlösung - Glucose und Glutathiondisulfid (BSS - Plus)

In dieser Versuchsreihe wurde das Microplasmin in BSS - Plus so gelöst, dass 250µg (4Units) Microplasmin in 0,2ml Lösungsmittel vorlagen. Es wurden dann jeweils 0,2ml in drei Augen injiziert. Das Partnerauge erhielt 0,2ml des nativen Lösungsmittels BBS - Plus. [Tab.4]

Tabelle 4: Applizierte Dosis von Microplasmin gelöst in BSS - Plus

Anzahl der Augenpaare	Dosis von Microplasmin (µg)	Lösungsmittel
3	250	BSS - Plus

3. Ergebnisse

3.1. Makroskopische und mikroskopische Befunde

Im Gegensatz zu humanen Augen zeigt sich in den Schweineaugen eine veränderte Gefäßversorgung der Netzhaut. Hierbei besteht keine Zentralarterie per se, sondern es lassen sich drei Arterienäste erkennen. Des Weiteren besitzt das Schweineauge eine dickere Glaskörperrinde mit starken Anheftungen an der ILM. [18]

3.2. Rasterelektronenmikroskopie

3.2.1. Chondroitinase ABC

Bei mit Chondroitinase ABC behandelten Bulbi sind in 1/6 Präparaten am hinteren Pol und in 5/6 Präparaten im Bereich des Äquators Anheftungen von Glaskörperresten nachweisbar. Bei niedriger Enzymkonzentration 1Unit pro 0,2ml ist im Präparat Nr.2 eine Glaskörperrinde oder ein kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen erkennbar, in den Präparaten Nr.1 und Nr.3 zeigt sich ein nicht kontinuierliches Kollagenfasernetz. Im Bereich des Äquators ist an allen drei Präparaten Nr.1, Nr.2 und Nr.3 eine Glaskörperanheftung nachweisbar. Auch bei höherer Konzentration von 5Units pro 0,2ml sind in den Präparaten Nr.4 und Nr.5 [Abbildungen 1 und 2] Glaskörperanheftungen am Äquator zu erkennen. Im Präparat Nr.6 [Abbildung 3] stellt sich ein nicht kontinuierliches Netz aus Kollagenfibrillen dar. Auch die Präparate des hinteren Pols Nr.4 [Abbildung 4], Nr.5 und Nr.6 zeigen ein nicht kontinuierliches Netz aus Kollagenfibrillen.

In der Kontrollgruppe zeigt sich bei 5/6 Präparaten am hinteren Pol und bei 4/6 Präparaten im Bereich des Äquators Glaskörperanheftungen. Bei Präparat Nr.3 sieht man ein nicht kontinuierliches Netzwerk aus Kollagenfibrillen am hinteren Pol. Am Äquator sind bei Präparat Nr.4 einzelne Kollagenfibrillen und bei Präparat Nr.5 ein nicht kontinuierliches Netz aus Kollagenfasern erkennbar. [Tab. 5]

Tabelle 5: Glaskörperreste nach Chondroitinase ABC Eingabe

Nummer und Konzentration von Chondroitinase ABC		Glaskörperreste			
		behandelte Augen		Kontrollaugen	
		hinterer Pol	Äquator	hinterer Pol	Äquator
1	1 Unit	++	+++	+++	+++
2	1 Unit	+++	+++	+++	+++
3	1 Unit	++	+++	++	+++
4	5 Units	++	+++	+++	+
5	5 Units	++	+++	+++	++
6	5 Units	++	++	+++	+++

+++ : Glaskörperrinde oder kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen

++ : nicht kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen

+ : einzelne Kollagenfibrillen

- : keine Kollagenfibrillen, glatte ILM

3.2.2. Dispase

Die mit Dispase behandelten Bulbi zeigen bei einer Enzymkonzentration von 1Unit/0,2ml in 2/3 Präparaten am hinteren Pol und in 2/2 (3) Präparaten am Äquator Glaskörperreste. Bei einer Konzentration von 5Units/0,2ml bestehen in 0/3 Präparaten am hinteren Pol und bei 2/3 Präparaten am Äquator Anheftungen. Bei niedriger Dosierung sind in den Präparaten Nr.1 [Abbildung 5] und Nr.2 am hinteren Pol Glaskörperreste zu erkennen. Im Präparat Nr.3 [Abbildung 6] sind einzelne Kollagenfibrillen auf der Oberfläche der ILM nachweisbar. Im Bereich des Äquators sind in Präparat Nr.2 und Nr.3 Glaskörperreste zu erkennen. Im Präparat Nr.1 [Abbildung 7] zeigt sich eine aufgerissene Oberfläche der ILM. Dieses Präparat wurde nicht weiter beurteilt. Bei höherer Dosierung zeigt sich in den Präparaten Nr.4 [Abbildung 8], Nr.5 und Nr.6 am hinteren Pol eine glatte ILM ohne Auflagerungen von Kollagenfibrillen. Am Äquator ist im Präparat Nr.6 [Abbildung 9] ebenfalls eine glatte ILM erkennbar. In den Präparaten Nr.4 [Abbildung 10] und Nr.5 liegt ein nicht kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen auf der Oberfläche der ILM.

In der Kontrollgruppe kann am hinteren Pol in 5/5 (6) Präparaten und am Äquator in 3/6 Präparaten ein anheftender Glaskörper nachgewiesen werden. Das Präparat Nr.4 zeigt eine aufgerissene Oberfläche der ILM am hinteren Pol. Das Präparat wurde nicht weiter beurteilt. Am Äquator zeigt sich in den Präparaten Nr.2, Nr.5 [Abbildung 11] und Nr.6 eine Glaskörperanheftung, bei den Präparaten Nr.3 und Nr.4 [Abbildung 12] stellt sich ein nicht kontinuierliches Netz aus Kollagenfibrillen dar. Im Präparat Nr.1 sind einzelne Kollagenfibrillen erkennbar. [Tab.6]

Tabelle 6: Glaskörperreste nach Dispaseeingabe

Nummer und Konzentration von Dispase		Glaskörperreste			
		behandelte Augen		Kontrollaugen	
		hinterer Pol	Äquator	hinterer Pol	Äquator
1	1 Unit	+++	zerrissen	+++	+
2	1 Unit	+++	+++	+++	+++
3	1 Unit	+	+++	+++	++
4	5 Units	-	++	zerrissen	++
5	5 Units	-	++	+++	+++
6	5 Units	-	-	+++	+++

+++ : Glaskörperrinde oder kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen

++ : nicht kontinuierliches Netz aus Kollagenfibrillen

+ : einzelne Kollagenfibrillen

- : keine Kollagenfibrillen, glatte ILM

3.2.3. Microplasmin

3.2.3.1. Microplasmin gelöst in Calcium und Magnesium freier - Phosphat gepufferter Lösung (CMF - PBS)

Bei der Auswertung der Präparate zeigen sich in den Dosierungen 62,5µg, 125µg und 187,5µg am hinteren Pol in 7/9 Präparaten und am Äquator in 8/9 Präparaten Glaskörperreste. Im Präparat Nr.3 sind einzelne Kollagenfibrillen, im Präparat Nr.5 [Abbildung 13] ist eine glatte ILM am hinteren Pol nachweisbar.

In der Kontrollgruppe bestehen am hinteren Pol in 8/9 Präparaten und am Äquator in 9/9 Präparaten Glaskörperanheftungen. Im Präparat Nr.4 ist am hinteren Pol ein nicht kontinuierliches Netz aus Kollagenfibrillen erkennbar.

Bei den Präparaten mit 250µg Microplasmin ist in 2/3 Präparaten eine glatte Oberfläche der ILM am hinteren Pol erkennbar. Dies sind Präparate Nr.11 und Nr.12 [Abbildung 14]. Präparat Nr.10 [Abbildung 15] zeigt ein nicht kontinuierliches Netzwerk von Kollagenfibrillen. Am Äquator sind ebenfalls 2/3 Präparate mit einer glatten ILM zu erkennen. Dies sind Präparate Nr.10 und Nr.12 [Abbildung 16], wohingegen Präparat Nr.11 [Abbildung 17] vereinzelt Kollagenfibrillen auf der Oberfläche aufweist.

In der Kontrollgruppe ist am Äquator in 3/3 Präparaten eine anheftende Glaskörperrinde erkennbar, wie z.B. bei Präparat Nr.12 [Abbildung 18].

Am hinteren Pol sind 3/3 Präparate ohne nachweisbare Kollagenfibrillen, wie z.B. Präparat Nr.11 [Abbildung 19]. Ihre Oberflächen zeigen Veränderungen im Sinne eines Schrumpfungsprozesses, sie sind unregelmäßig. [Tab.7]

Tabelle 7: Glaskörperreste nach Microplasmineingabe gelöst in CMF - PBS

Nummer und Dosis von Microplasmin (μg) gelöst in CMF - PBS		Glaskörperreste			
		behandelte Augen		Kontrollaugen	
		hinterer Pol	Äquator	hinterer Pol	Äquator
1	62,5	+++	+	+++	+++
2	62,5	+++	+++	+++	+++
3	62,5	+	+++	+++	+++
4	125	+++	+++	++	+++
5	125	-	+++	+++	+++
6	125	+++	+++	+++	+++
7	187,5	+++	+++	+++	+++
8	187,5	+++	+++	+++	+++
9	187,5	+++	+++	+++	+++
10	250	++	-	- (*)	+++
11	250	-	+	- (*)	+++
12	250	-	-	- (*)	+++

+++ : Glaskörperinde oder kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen

++ : nicht kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen

+: einzelne Kollagenfibrillen

- : keine Kollagenfibrillen, glatte ILM

(*) : unregelmäßige Oberfläche der ILM

3.2.3.2. Microplasmin gelöst in neutraler Salzlösung - Glucose und Glutathiondisulfid (BSS - Plus)

Nachdem eine glatte Oberfläche in den Präparaten mit 250µg Microplasmin gelöst in CMF - PBS dargestellt werden konnte, führten wir den gleichen Versuch mit 250µg Microplasmin gelöst in BSS - Plus durch.

Hierbei zeigt sich in allen Präparaten, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den mit Enzym behandelten Augen, eine strukturelle Veränderung der ILM Oberfläche. Sie ist in der größten Vergrößerung unregelmäßig und stammt am ehesten von Schrumpfungsprozessen.

Bei den Präparaten mit 250µg Mikroplasmin ist im Bereich des hinteren Pols, Präparat Nr.1 [Abbildung 20] und auch am Äquator, Präparat Nr.1 [Abbildung 21] jeweils in 3/3 Präparaten eine unregelmäßige ILM Oberfläche ohne Kollagenfibrillen oder Glaskörperanheftungen erkennbar.

In der Kontrollgruppe ist am hinteren Pol bei 2/3 Präparaten eine unregelmäßige ILM Oberfläche ohne Auflagerungen erkennbar. Im Präparat Nr.2 [Abbildung 22] liegt ein kontinuierliches Netz aus Kollagenfibrillen und Glaskörperinnenresten auf der unregelmäßigen ILM Oberfläche.

Im Bereich des Äquators ist in 1/3 Präparaten eine unregelmäßige ILM Oberfläche ohne Auflagerungen erkennbar. Dies ist Präparat Nr.2 [Abbildung 23]. In den Präparaten Nr.1 und Nr.3 [Abbildung 24] zeigt sich bei unregelmäßiger ILM Oberfläche ein nicht kontinuierliches Netz aus Kollagenfibrillen. [Tab.8]

Tabelle 8: Glaskörperreste nach Microplasmineingabe gelöst in BSS - Plus

Nummer und Dosis von Microplasmin (μg) gelöst in BSS - Plus		Anzahl von Glaskörperreste			
		behandelte Augen		Kontrollaugen	
		hinterer Pol	Äquator	hinterer Pol	Äquator
1	250	- (*)	- (*)	- (*)	++ (*)
2	250	- (*)	- (*)	+++ (*)	- (*)
3	250	- (*)	- (*)	- (*)	++ (*)

+++ : Glaskörperrinde oder kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen

++ : nicht kontinuierliches Netz von Kollagenfibrillen

+ : einzelne Kollagenfibrillen

- : keine Kollagenfibrillen, glatte ILM

(*) : unregelmäßige Oberfläche der ILM

4. Diskussion

Durchforscht man die Literatur, so sind verschiedene Enzyme mit Einfluss auf den Glaskörper beschrieben worden. Dies sind zum einen spezifische und zum anderen unspezifische Proteasen. Beide haben unterschiedliche Wirkungen auf den Glaskörper und dessen Grenzflächen sowie auf die extrazelluläre Matrix.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die spezifische Protease Chondroitinase ABC keine hintere Glaskörperabhebung bei einer Dosierung von 5Units bewirkt. Die unspezifischen Proteasen Dispase bei 5Units und Microplasmin bei einer Dosierung von 4Units hingegen können eine hintere Glaskörperabhebung mit einer glatten ILM bzw. mit vereinzelt aufgelagerten Kollagenfibrillen hervorrufen.

Es wurden erwachsene Schweineaugen verwendet, da sich schon in anderen Studien zeigte, dass diese eine dichte Glaskörperrinde mit einer starken Adhärenz besitzen, und von spontanen hinteren Glaskörperabhebungen nicht berichtet wurde.[40]

HAGEMAN et al.[19] beschrieben an Affen Augen und humanen post-mortem Augen, dass der Einsatz der spezifischen Protease Chondroitinase ABC in Kombination mit einer Vitrektomie bei einer epiretinalen Membranbildung die Notwendigkeit der mechanischen operativen Entfernung überflüssig werden lässt. Hierbei kam es neben einer hinteren Glaskörperabhebung auch zu einer Abhebung des Glaskörpers im Bereich der Glaskörperbasis und im Bereich der Linsenrückfläche. Die untersuchte ILM war morphologisch intakt. Die in dieser Untersuchungsreihe verwendete Dosierung (20-10.000IU) lag deutlich über der in unserer Untersuchungsreihe verwendeten Dosierung.

HEEGAARD et al.[22] zeigten an Affen Augen in einer zuvor durchgeführten Untersuchung des Aufbaus der ILM, dass nach Behandlung der ILM mit Chondroitinase ABC sich keine strukturellen Veränderungen nachweisen ließen. Die Wirkung von Chondroitinase ABC besteht in einer Spaltung von Chondroitinsulfat und dieses Glycosaminoglycan liegt nur in einer sehr geringen Konzentration in der ILM vor.[22,44]

In unserer Untersuchung konnte die unspezifische Protease Chondroitinase ABC in einer Maximaldosierung von 5 Units keine hintere Glaskörperabhebung hervorrufen. Es waren multiple Glaskörperanheftungen in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nachweisbar. Wir wählten eine fünffach höhere Konzentration von Chondroitinase ABC im Vergleich zu einer zuvor durchgeführten Untersuchung von HERMEL et al.[26] in welcher kein Effekt an der vitreoretinalen Grenzfläche festgestellt werden konnte.

Ein weiteres Glycosaminoglycan ist die Hyaluronsäure. AZUMA et al.[6] zeigten, dass dieses das am häufigsten im Glaskörper vorkommende ist und in hoher Konzentration insbesondere im Kern des Glaskörpers vorliegt. Es ist für dessen Viskosität durch die Verflechtung von Kollagenfibrillen untereinander verantwortlich.

HIKICHI et al.[27] zeigten an Kaninchenaugen, dass die Hyaluronidase jedoch nicht eine Reduktion der Adhäsionen zwischen Glaskörper und ILM bewirkt, da ihr eine Wirkung auf Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV fehlt. Eine vermehrt nachgewiesene hintere Glaskörperabhebung war mit großer Wahrscheinlichkeit durch die gesteigerte Mobilität des verflüssigten Glaskörpers sekundär induziert worden, da auf der Oberfläche der ILM verbliebene vitreale Kollagenfibrillen nachgewiesen werden konnten. HAROONI et al.[21] beschrieben schon einige Jahre zuvor bei Kaninchenaugen eine Glaskörperverflüssigung mit anschließender hinterer Glaskörperabhebung, jedoch untersuchten die Autoren die ILM nur mittels histologischer Schnittpräparate. So war ein Nachweis von vitrealen Kollagenfibrillen auf der ILM nicht möglich. Von den Autoren HIKICHI et al.[27] wurde der Effekt einer Verflüssigung des Glaskörpers ohne gleichzeitig einhergehender Separation der Glaskörperrinde von der ILM kritisch beurteilt, da dies zu vitreoretinalen Traktionen am hinteren Pol und in der Peripherie zu entsprechenden Komplikationen, wie Netzhautrisse und Netzhautablösung führen kann.

HEEGARD et al.[22] konnten an Affenagen Veränderungen nach einer Behandlung mit Hyaluronidase auf der ILM nachweisen. Das fibrilläre Netzwerk der ILM erschien unregelmäßig und darauf waren kugelförmige Gebilde nachweisbar.

Betrachtet man unspezifische Proteasen, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied gegenüber den zuvor betrachteten spezifischen Proteasen.

Die ILM der Affen Augen war durch die Behandlung mit Kollagenase wie HEEGARD et al.[22] deutlich verändert. Es war flockiges Material auf einem zerrissenen Netzwerk der ILM nachzuweisen. Die deutlichsten Veränderungen waren durch Pronase verursacht worden. Die ILM war größtenteils zerstört, es war nur noch ein feines flockiges Material ohne Nachweis des ursprünglichen ILM Aufbaus nachweisbar.

Dispase hingegen, ebenfalls eine unspezifische Protease, hat eine hohe Affinität zu Fibronectin und Kollagen IV. Dadurch kann sie die Adhäsionen zwischen Glaskörperinnenseite und ILM lösen und zu einer hinteren Glaskörperabhebung führen. Dies konnte sowohl an Schweineaugen wie auch an humanen post-mortem Augen von TEZEL et al.[48] gezeigt werden. In dieser Untersuchung wurde beschrieben, dass die Oberfläche der ILM Veränderungen aufwies. Dies war zum einen der Verlust der Lamina rara externa und zum anderen strukturelle Veränderungen der Lamina densa. Es konnte eine amorphe Oberflächenstruktur dargestellt werden und es waren auch Müllersche Stützzellen mit ihren polygonalen Endplatten erkennbar.[48]

In der von uns durchgeführten Untersuchung zeigte sich bei einer Dosierung von 5 Units und 30 Minuten Inkubationszeit in den Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie eine glatte ILM ohne Glaskörperanheftungen und Kollagenfaserauflagerungen am hinteren Pol. Im Bereich des Äquators war dieses Ergebnis nicht so deutlich. Es lagen vereinzelt Kollagenfaseranheftungen vor.

Die von TEZEL et al.[48] geschilderten morphologischen Veränderungen der ILM konnten in unserer Untersuchung nicht gezeigt werden. In einem Präparat [Abbildung 7] lag eine aufgerissene ILM vor. Dies war am wahrscheinlichsten präparationsbedingt verursacht, da bei höherer Konzentration dies nicht erneut beobachtet wurde. In allen anderen Präparaten war stets eine intakte ILM zu erkennen. Ob es zu einer Separation des Glaskörpers durch seine Wirkung gegenüber Kollagen IV auch im Bereich der Glaskörperbasis kam, wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht beurteilt. Ebenfalls wurde nicht beurteilt ob es zu einer Verflüssigung des Glaskörpers kam.

VALERIA CANTO SOLER et al.[49] beschrieben nach intravitrealer Applikation von Dispase an Mäuseaugen ein gehäuftes Auftreten von epi- und subretinalen Membranen. Ebenfalls waren hierbei Glaskörperhämorrhagien gehäuft aufgetreten. Sie führten dies auf eine Störung der Blut-Retina-Schranke zurück. Wie schon in früheren Untersuchungen von

YOSHINO et al.[52] gezeigt wurde stellt eine Glaskörperhämorrhagie einen prädisponierenden Faktor für die Entstehung einer proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) dar. Doch auch ohne Glaskörperhämorrhagie zeigten VALERIA CANTO SOLER et al.[49] eine erhöhte Membranentstehungsrate nach Gabe von Dispase. Es wurde eine Schädigung der retinalen Pigmentepithelbarriere mit anschließender Zellimmigration in den Glaskörper als Ursache vermutet und daraus ein heute etabliertes Tiermodell der PVR abgeleitet.

Eine weitere unspezifische Protease ist Plasmin, bzw. rekombinant hergestelltes Microplasmin. Es hydrolysiert eine Vielzahl von Glycoproteinen, so auch Laminin und Fibronectin. Eine Wirkung an Kollagen IV konnte nicht nachgewiesen werden.

In einer Untersuchung beschrieb VERSTRAETEN et al.[51], dass die alleinige intravitreale Injektion von Plasmin in Kaninchenaugen keine hintere Glaskörperabhebung hervorruft. Diese wurde durch indirekte Ophthalmoskopie beurteilt.

In der von VERSTRAETEN et al.[51] anschließend durchgeführten Elektronenmikroskopie waren nur vereinzelte Kollagenfasern und keine Glaskörperanheftungen erkennbar. Eine Vitrektomie im Anschluss an eine intravitreale Plasminengabe zeigte eine hintere Glaskörperabhebung intraoperativ. Postoperativ war in der Elektroretinographie eine abgeflachte Amplitude in der b-Welle nachweisbar. Diese normalisierte sich nahezu vollständig im Laufe einer Woche. Es wird angenommen, dass die hohe Osmolarität der Plasminlösung für diese temporäre Veränderung im Elektroretinogramm verantwortlich war. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine maximale Enzymaktivität zwischen der 15. Minute und der 60. Minute nach intravitrealer Plasminapplikation bestand. Die Aktivität nahm danach ab und lag nach 24 Stunden unter der Nachweisbarkeit. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Vitrektomie 30 bis 60 Minuten nach Plasminengabe erzielt. HIKICHI et al.[28] kombinierten die Enzyminjektion mit einer Eingabe von SF₆-Gas in Kaninchenaugen und induzierten so ohne Vitrektomie eine hintere Glaskörperabhebung mit Glaskörperverflüssigung. LI et al.[37] injizierten in humane Spenderaugen Plasmin. Sie erkannten, dass mit ansteigender Enzymkonzentration die Adhäsionen zwischen Glaskörperrinde und Netzhaut abnahmen. Bei einer Dosis von 3Units konnte eine vollständige hintere Glaskörperabhebung induziert werden, die ILM war glatt, und es zeigten sich regelrechte morphologische Netzhautstrukturen in der Elektronenmikroskopie. Somit ist weder eine Vitrektomie noch eine Gaseingabe für den Effekt von Plasmin erforderlich. Dies

war zuvor schon von GANDORFER et al. an Schweineaugen[11], später an Katzen- und humanen post-mortem Augen[13] gezeigt worden.

Neben Kollagen Typ I und Typ IV sind auch extrazelluläre Glycoproteine wie Fibronectin und Laminin am Aufbau der ILM beteiligt wie KOHNO et al.[35] zeigten. Diese sind für die Adhäsion des Glaskörpers mit der ILM verantwortlich, da sie die Kollagenfasern der Glaskörperrinde mit denen der ILM verknüpfen. Fibronectin bindet mit hoher Affinität an Kollagen Typ II und Hyaluronsäure, zwei Hauptbestandteile des Glaskörpers, und Laminin an Kollagen Typ IV als Hauptbestandteil von Basallaminae.[35]

Plasmin als unspezifische Protease greift an diesen Komponenten der Basalmembran an. Es spaltet die Glycoproteine Fibronectin und Laminin. So entfaltet Plasmin seine Aktivität im Bereich des vitreoretinalen Überganges und führt zu einer Abhebung des hinteren Glaskörpers.[13,37]

Wir konnten eine vollständige hintere Glaskörperabhebung mit Mikroplasmin bei einer Dosierung von 4Units gelöst in CMF - PBS und 30 Minuten Inkubationszeit nachweisen. Im Rasterelektronenmikroskop bestanden keine morphologischen Veränderungen der ILM selbst. Bei gleicher Dosierung und Inkubationszeit, jedoch BBS - Plus als Lösungsmittel, zeigten sich sowohl in den behandelten Augen wie auch in der Kontrollgruppe eine unregelmäßige Oberfläche der ILM. Unseres Erachtens wurde diese strukturelle Veränderung am ehesten durch Schrumpfungsprozesse der Präparate hervorgerufen. Im Rahmen des alltäglichen klinischen Einsatzes von BSS - Plus sind solche Veränderungen der ILM bis heute nicht beschrieben worden.

Traktionen im Bereich der Makula können durch bestehende vitreoretinale Adhärenzen bei inkompletter hinterer Glaskörperabhebung wie beim „vitreoretinalen Traktionssyndrom“ oder durch Kontraktionen von epiretinalen Membranen in diesem Bereich verursacht werden.

Bei Patienten mit einer epiretinalen Membranbildung liegt zu 60% bis 100% ein abgehobener hinterer Glaskörper vor.[25] Der Mechanismus einer hinteren Glaskörperabhebung wird als mitentscheidend bei der Pathogenese der epiretinalen Membranbildung angesehen. Im Rahmen einer Abhebung wird eine Schädigung der ILM mit Übertritt von Zellen in den Glaskörperraum postuliert. Bei der Untersuchung der Membranen identifizierten HEILKOV

et al.[24] verschiedene zelluläre Strukturen sowie extrazelluläre Matrix.[5,25,47] Die untersuchten Membranen ähnelten denen von MARGHERIO et al.[39], welche Membranen bei vitreomakulären Traktionssyndromen untersuchten.

KAMPIK et al.[32] beschrieben fünf verschiedene Zelltypen. Dies sind retinale Pigmentepithelzellen, Makrophagen, Fibrozyten, fibröse Astrozyten sowie myofibroblastenartige Zellen, welche in epiretinalen Membranen nachgewiesen wurden. Die Membranen unterschieden sich durch einen ein- bzw. mehrschichtigen Aufbau vornehmlich aus fibrösen Astrozyten und durch die Anordnung der Kollagenfibrillen.

Bei der Untersuchung des vitreoretinalen Traktionssyndroms zeigten GANDORFER. et al.[12] zwei Pathologien. Zum einen ließen sich epiretinale Membranen getrennt von der ILM durch natives Kollagen nachweisen. Zum anderen fand man eine ein- oder mehrschichtige zelluläre Schicht direkt der ILM aufliegend. Die Autoren sehen dies in engem Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankungen, abhängig von der Vollständigkeit der hinteren Glaskörperabhebung. In beiden Membranen waren Myofibroblasten der dominierende Zelltyp.

Einige Autoren sehen die Pathogenese der hinteren Glaskörperabhebung als wesentlichen Mechanismus bei der Entstehung von Makulaforamina an. AKIBA et al.[2,4] nehmen eine nach anterior, bzw. tangential gerichtete Kontraktion als Mechanismus an, da sie in vielen Fällen einen abgehobenen hinteren Glaskörper vorfanden.

Im Rahmen der operativen Versorgung des Makulaforamen konnten KELLY et al.[34] zeigen, dass es in der Mehrzahl der Fälle zu einem Visusanstieg nach Vitrektomie kommt. In einigen Fällen war die epiretinale Membran präoperativ nicht, und selbst intraoperativ nur schwer erkennbar. So fiel möglicherweise die Zahl der mikroskopisch beurteilten epiretinalen Membranen und vermutlich auch die der mikroskopisch beurteilten Glaskörperanheftungen zu gering aus, da sie gelegentlich nur intraoperativ oder vielleicht nur mit heutigen hochauflösenden bildgebenden Verfahren wie der Optical Coherence Tomographie (OCT) darstellbar gewesen wären.

Bei dem vitreoretinalen Traktionssyndrom, bei der epiretinalen Gliose, wie auch beim Makulaforamen könnte die intravitreale Eingabe von Dispase oder Microplasmin zu einer Separation des Glaskörpers von der ILM führen. Dies könnte in einem Frühstadium die

bestehende foveale Traktion lösen, wodurch ein Fortschreiten verhindert und die Visusminderung gestoppt werden würde.

Betrachtet man zusätzlich noch die diabetische Retinopathie, so könnte der Einsatz von unspezifischen Proteasen die Prognose verbessern, da die partielle Glaskörperanheftung, wie von JALKH et al.[29] beschrieben, ein Risikofaktor für das Fortschreiten der proliferativen diabetischen Retinopathie darstellt. Die noch bestehenden Glaskörperadhäsionen könnten durch die Eingabe von Dispase oder Microplasmin gelöst und dadurch die Progression verhindert werden.

Letztendlich könnte es für die vitreoretinale Chirurgie von großem Nutzen sein, diese unspezifischen Proteasen in weiteren Untersuchungen auf ihren Einsatz an humanen Augen zu untersuchen. Sowohl Dispase als auch Plasmin oder Mikroplasmin scheinen hierfür ein geeignetes Wirkprofil zu besitzen. Weiterführende Untersuchungen sind nötig um den Einsatz dieser Enzyme bei der Vitrektomie zu erforschen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vitreoretinalen Chirurgie sind in der Vergangenheit viele operative Fortschritte durch den ergänzenden introoperativen Einsatz von Substanzen wie Silikonöl, Gas und schwerer Flüssigkeit erreicht worden. Trotzdem ist der Wunsch nach neuen Substanzen ungebrochen. An oberster Stelle dieser Wunschliste steht der Einsatz von Enzymen. Das Ziel einer enzymatischen Glaskörperbehandlung ist die hintere Glaskörperabhebung und die Glaskörperverflüssigung. Dies würde minimal invasive Eingriffe bei einer Vielzahl von vitreoretinalen Erkrankungen ermöglichen, wodurch sich weniger Komplikationen, eine kürzere Operationszeit und ggf. geringere Kosten erzielen ließen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von drei Enzymen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die vitreoretinale Grenzfläche betrachtet. Hierbei handelte es sich um die spezifische Protease Chondroitinase ABC, welche Chondroitinsulfat spaltet; um die unspezifischen Proteasen Microplasmin, ein in seiner Molekülstruktur verändertes rekombinantes Plasmin, und um Dispase. Letzteres spaltet Fibronectin und Kollagen Typ IV, wohingegen Microplasmin plasmingleiche Eigenschaften besitzt und Fibronectin und Laminin spaltet.

Bei Chondroitinase ABC konnte kein Effekt nachgewiesen werden. Dispase zeigte bei einer Dosierung von 5Units eine glatte ILM am hinteren Pol und Microplasmin gelöst in CMF - PBS bei einer Dosierung von 4Units eine glatte ILM sowohl am hinteren Pol als auch am Äquator.

Weiterführende Untersuchungen haben bestätigt, dass Microplasmin eine vollständige hintere Glaskörperabhebung mit kollagenfibrillenfreier ILM induzieren kann.

Derzeit befindet sich Microplasmin in der klinischen Erprobung zur Therapie vitreoretinaler Erkrankungen.

6. Abbildungen

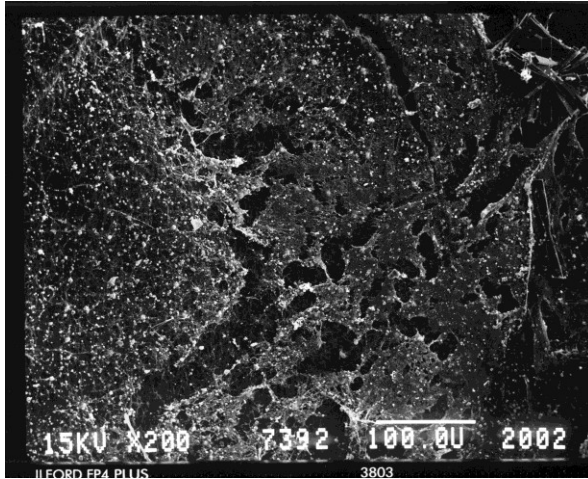


Abbildung 1:

Glaskörper auf der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 5Units pro 0,2ml Chondroitinase ABC; Präparat Nr.4

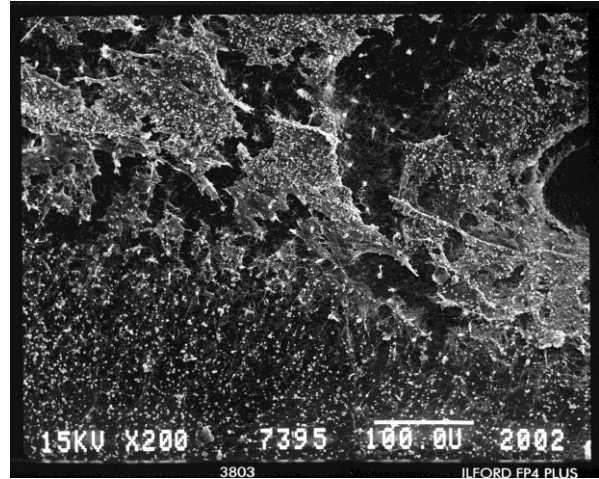


Abbildung 2:

Glaskörper auf der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 5Units pro 0,2ml Chondroitinase ABC; Präparat Nr.5

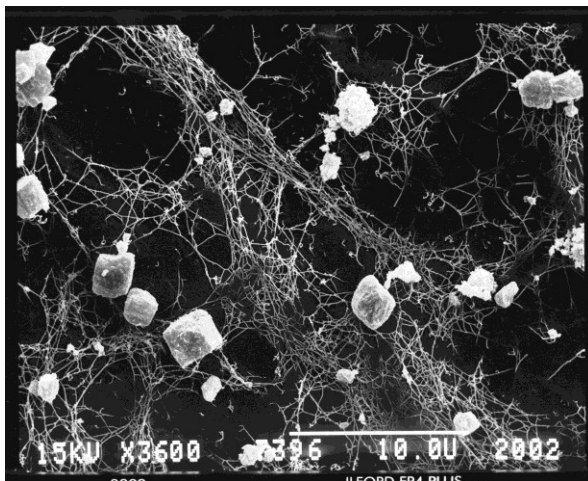


Abbildung 3:

Netz aus Kollagenfibrillen auf der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 5Units pro 0,2ml Chondroitinase ABC; Präparat Nr.6

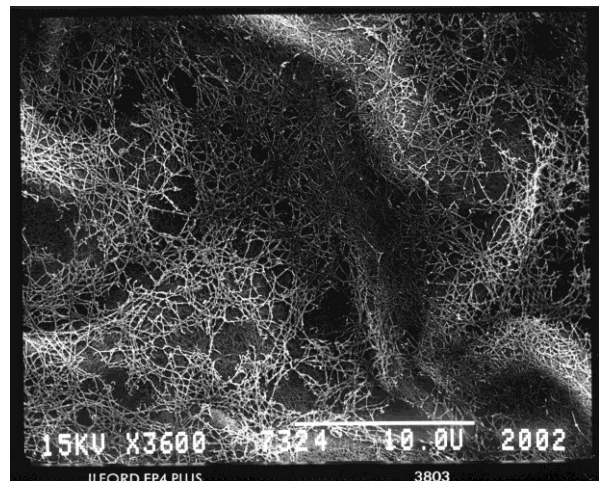


Abbildung 4:

Netz aus Kollagenfibrillen auf der ILM im Bereich des hinteren Pols nach Behandlung mit 5Units pro 0,2ml Chondroitinase ABC; Präparat Nr.4

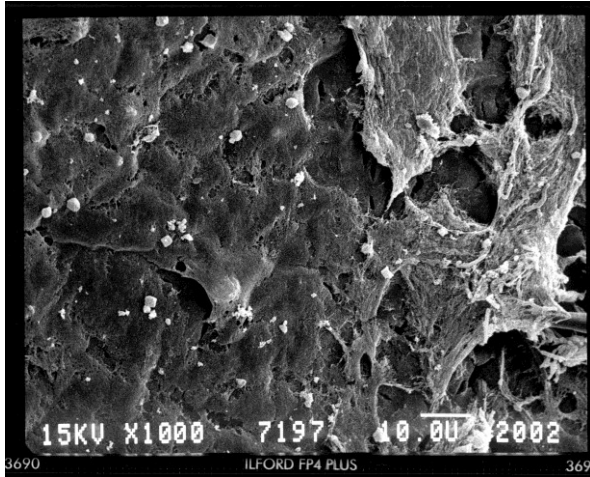


Abbildung 5:

Glaskörper auf der ILM im Bereich des hinteren Pols nach Behandlung mit 1Unit pro 0,2ml Dispase; Präparat Nr.1

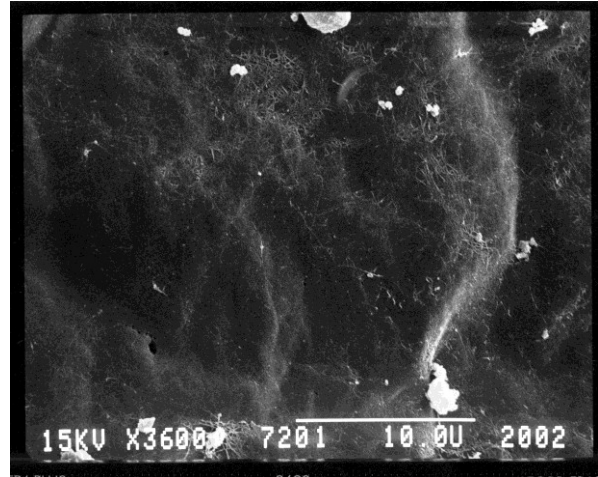


Abbildung 6:

Einzelne Kollagenfibrillen auf der ILM im Bereich des hinteren Pols nach Behandlung mit 1Unit pro 0,2ml Dispase; Präparat Nr.3

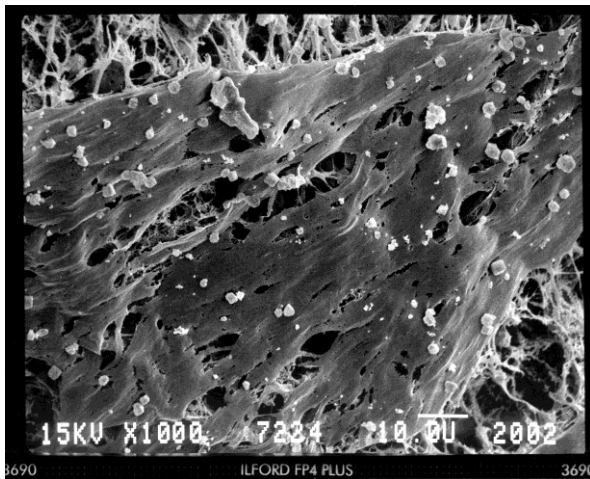


Abbildung 7:

Aufgerissene Oberfläche der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 1Unit pro 0,2ml Dispase; Präparat Nr.1

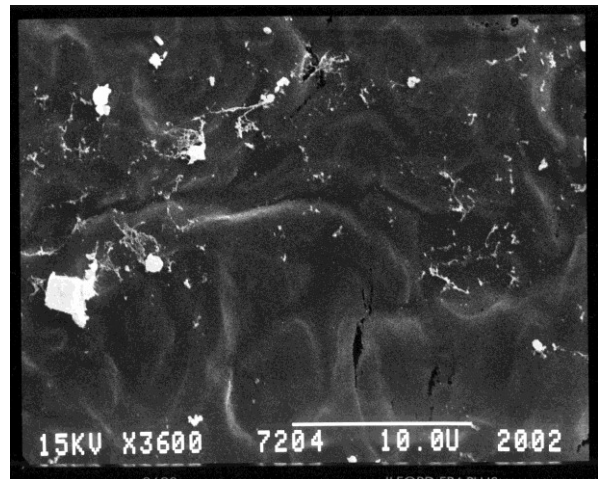


Abbildung 8:

Glatte ILM-Oberfläche im Bereich des hinteren Pols ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 5Units pro 0,2ml Dispase; Präparat Nr.4

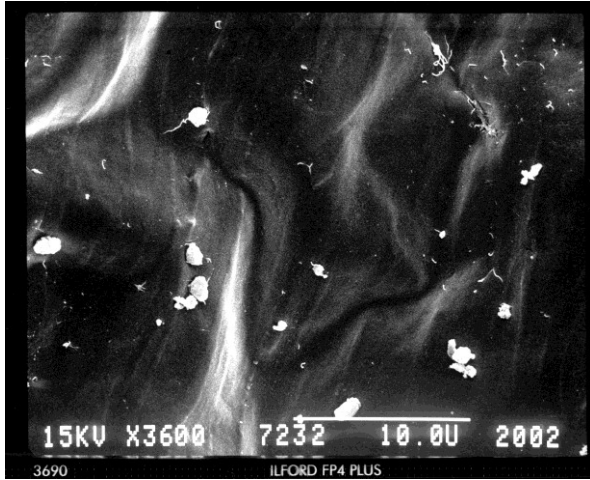


Abbildung 9:

Glatte ILM-Oberfläche im Bereich des Äquators ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 5Units pro 0,2ml Dispase; Präparat Nr.6

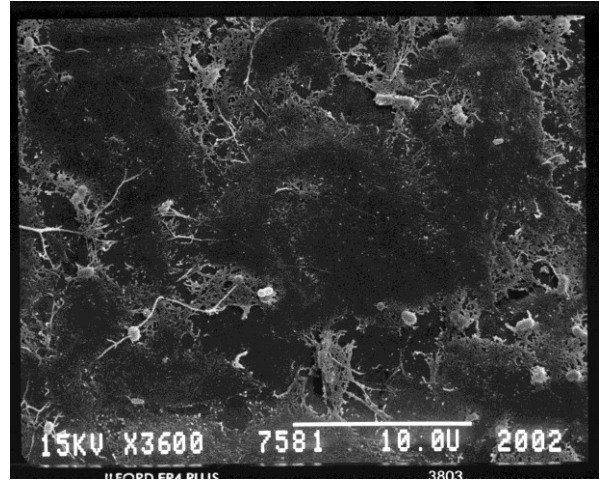


Abbildung 10:

Netz aus Kollagenfibrillen auf der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 5Units pro 0,2ml Dispase; Präparat Nr.4

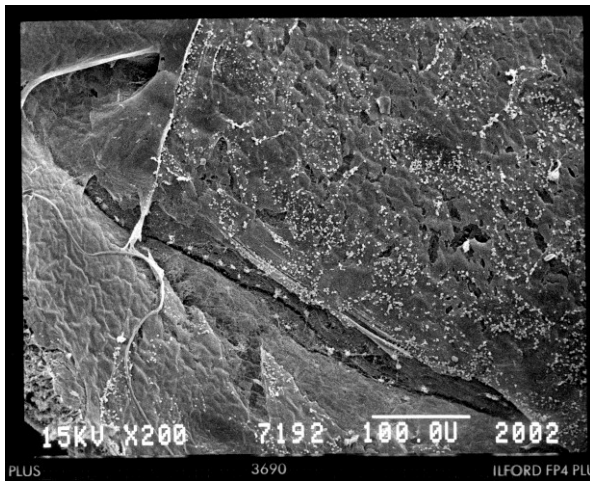


Abbildung 11:

Glaskörper auf der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 0,2ml CMF-PBS (Kontrollgruppe); Präparat Nr.5

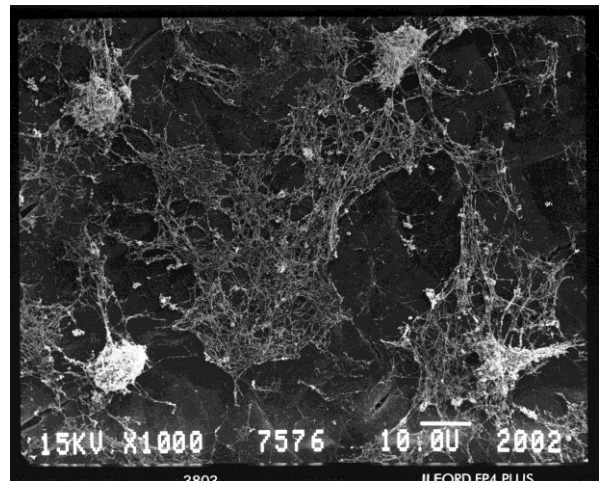


Abbildung 12:

Netz aus Kollagenfibrillen auf der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 0,2ml CMF-PBS (Kontrollgruppe); Präparat Nr.4

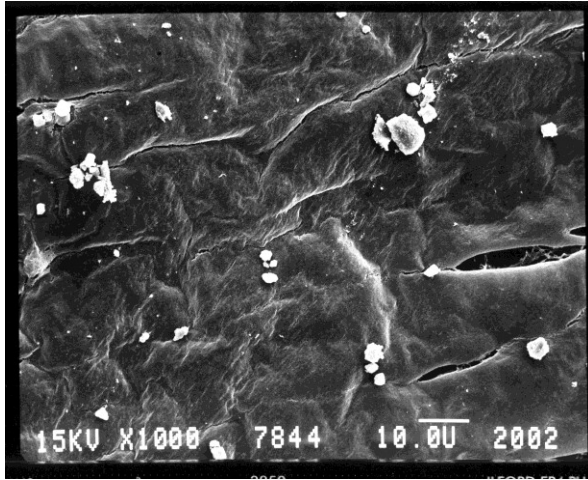


Abbildung 13:

Glatte ILM-Oberfläche im Bereich des hinteren Pols ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 125µg Microplasmin pro 0,2ml CMF-PBS; Präparat Nr.5

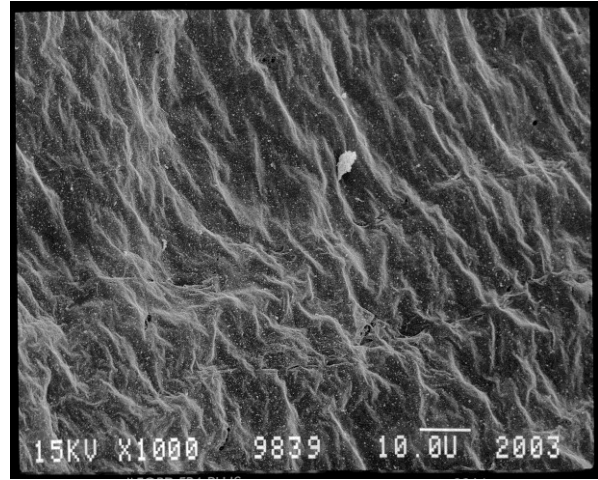


Abbildung 14:

Glatte ILM-Oberfläche im Bereich des hinteren Pols ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 250µg Microplasmin pro 0,2ml CMF-PBS; Präparat Nr.12

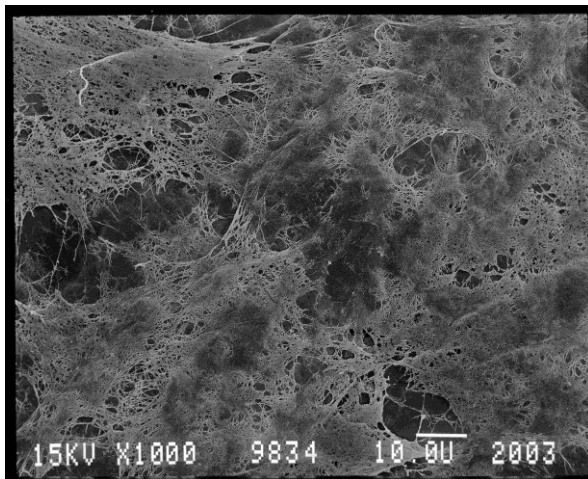


Abbildung 15:

Netz aus Kollagenfibrillen auf der ILM im Bereich des hinteren Pols nach Behandlung mit 250µg Microplasmin pro 0,2ml CMF-PBS; Präparat Nr.10

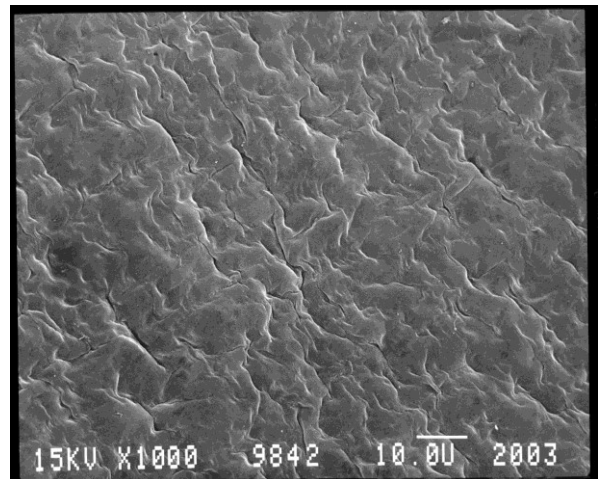


Abbildung 16:

Glatte ILM-Oberfläche im Bereich des Äquators ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 250µg Microplasmin pro 0,2ml CMF-PBS; Präparat Nr.10

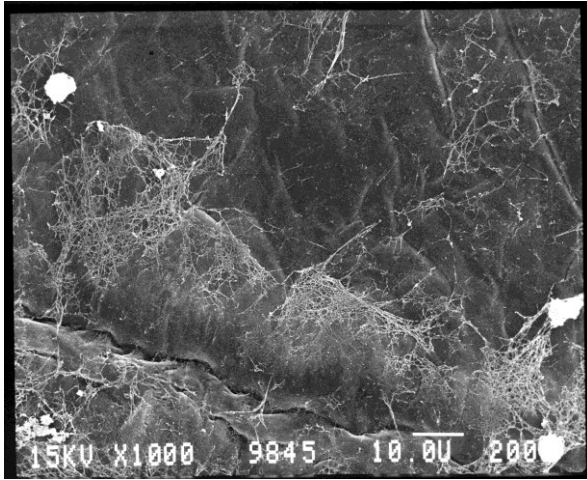


Abbildung 17:

Einzelne Kollagenfibrillen auf der ILM im Bereich des Äquators nach Behandlung mit 250µg Microplasmin pro 0,2ml CMF-PBS; Präparat Nr.11

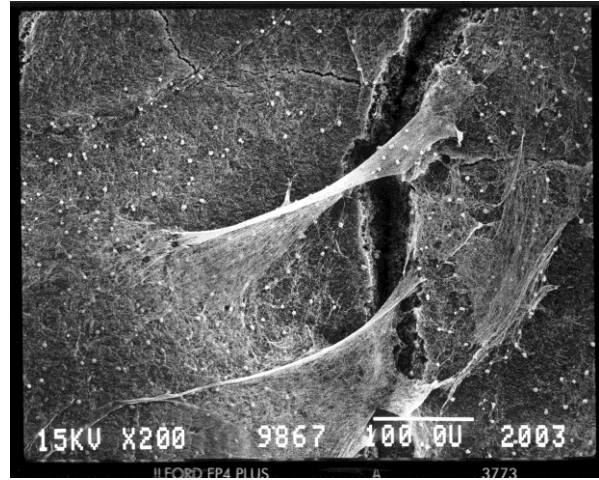


Abbildung 18:

Glaskörper auf der ILM im Bereich der Äquators nach Behandlung mit 0,2ml CMF-PBS (Kontrollgruppe); Präparat Nr.12

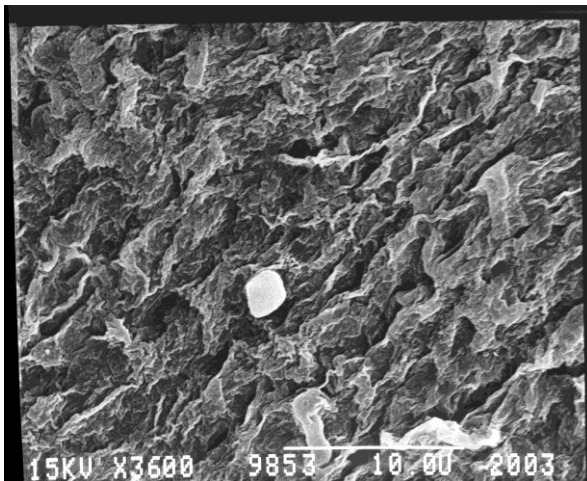


Abbildung 19:

ILM-Oberfläche im Bereich des hinteren Pols ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 0,2ml CMF-PBS; Präparat Nr.11

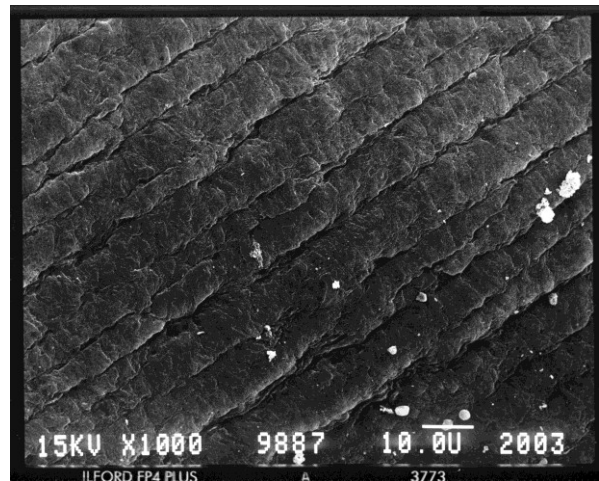


Abbildung 20:

ILM-Oberfläche im Bereich des hinteren Pols ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 250µg Microplasmin pro 0,2ml BSS-Plus; Präparat Nr.1



Abbildung 21:

ILM-Oberfläche im Bereich des Äquators ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 250 µg Microplasmin pro 0,2ml BSS-Plus; Präparat Nr.1

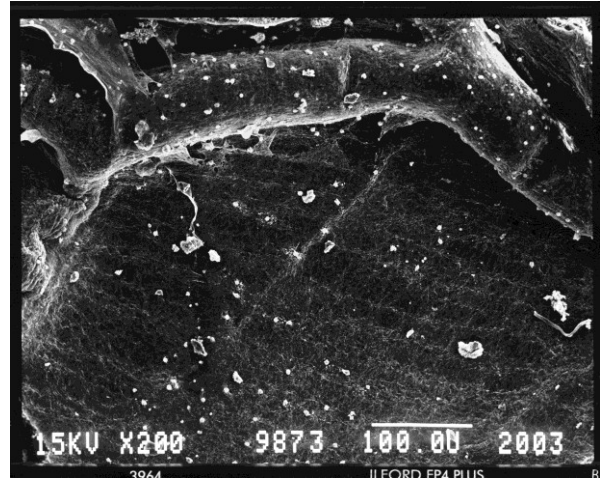


Abbildung 22:

Glaskörper auf ILM-Oberfläche im Bereich des hinteren Pols nach Behandlung mit 0,2ml BSS-Plus (Kontrollgruppe); Präparat Nr.2

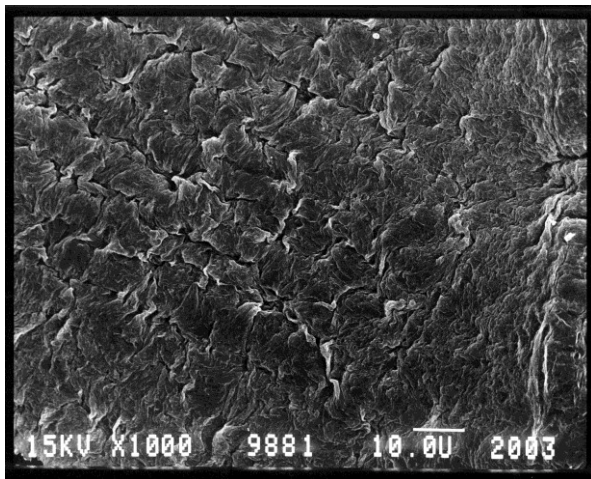


Abbildung 23:

ILM-Oberfläche im Bereich des Äquators ohne Kollagenfibrillen nach Behandlung mit 0,2ml BSS-Plus (Kontrollgruppe); Präparat Nr.2

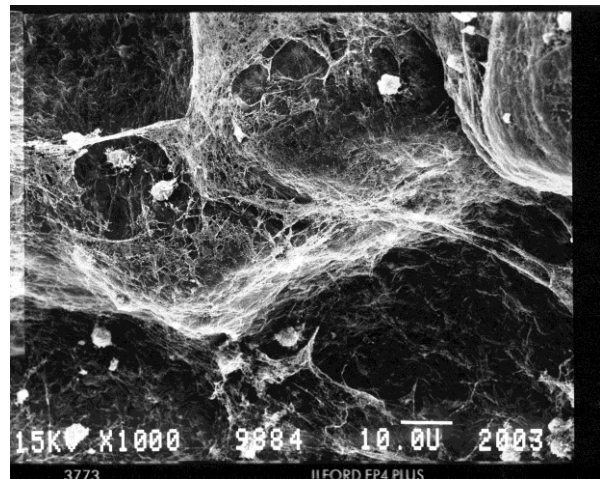


Abbildung 24:

Netz aus Kollagenfibrillen auf ILM-Oberfläche im Bereich des Äquators nach Behandlung mit BSS-Plus (Kontrollgruppe); Präparat Nr.3

7. Literaturverzeichnis

1. AKIBA J, ARZABE CW, TREMPE CL. Posterior vitreous detachment and neovascularization in diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1990; 97(7):889-891
2. AKIBA J, QUIROZ MA, TREMPE CL. Role of posterior vitreous detachment in idiopathic macular hole. *Ophthalmology* 1990; 97(12):1610-1613
3. AKIBA J, UENO N, et al. Molecular mechanisms of posterior vitreous detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993; 231(7):408-412
4. AKIBA J, YOSHIDA A, TREMPE CL. Risk of developing a macula hole. *Arch Ophthalmol* 1990; 108(8):1088-1090
5. APPIAH AP, HIROSE T, KADO M. A review of 324 cases of idiopathic premacular gliosis. *Am J Ophthalmol* 1988; 106(5):533-535
6. AZUMA N, TAJIMA S, et al. Glycosaminoglycan and collagen distribution in the developing human vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236(9):679-687
7. BHISITKUL RB. Anticipation for enzymatic vitreolysis [Editorials]. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(1):1-2
8. FOOS RY. Vitreoretinal juncture: Topographical variations. *Invest Ophthalmol* 1972; 11(10):801-808
9. FOOS RY, WHEELER NC. Vitreoretinal juncture; synchysis senilis and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology* 1982; 89(12):1502-1512
10. GANDORFER A, PRIGLINGER S, et al. Vitreoretinal morphology of plasmin treated human eyes. *Am J Ophthalmol* 2002; 133(1):156-159
11. GANDORFER A, PUTZ E, et al. Ultrastructure of the vitreoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(1):6-10

12. GANDORFER A, ROHLEDER M, KAMPIK A. Epiretinal pathology of vitreomacular traction syndrome. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(8):902-909
13. GANDORFER A, ROHLEDER M, SETHI C, ECKLE D, et al. Posterior vitreous detachment induced by Microplasmin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(2):641-647
14. GANDORFER A, ROHLEDER M, et al. Epiretinal pathology of diffuse diabetic macular edema associated with vitreomacular traction. *Am J Ophthalmol* 2005; 139(4):638-652
15. GASS JDM. Idiopathic senile macular hole:its early stages and development. *Arch Ophthalmol* 1988; 106(5):629-39.
16. GIEBEL SJ, MENICUCCI G, MCGUIRE PG, et al. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* 2005; 85(5):597-607
17. GONZALEZ-AVILA G, MENDEZ D, et al. Role of retinal detachment subretinal fluid on extracellular matrix metabolism. *Ophthalmologica* 2004; 218(1):49-56
18. GREGOR Z, RYAN SJ. Combined posterior contusion and penetrating injury in pig eye. II. Histological features. *Br J Ophthalmol* 1982; 66(12):799-804
19. HAGEMAN GS, RUSSELL SR, et al. Chondroitinase mediated disinsertion of the primate vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(4):1260(28)
20. HARA A. Surface structure of rabbit and human retina after enzymatic separation of the inner limiting membrane. *Jpn J Ophthalmol* 1994; 38(4):375-381
21. HAROONI M, MCMILLIAN T, REFOJO M. Efficacy and safety of enzymatic posterior vitreous detachment by intravitreal injection of Hyaluronidase. *Retina* 1998; 18(1):16-22
22. HEEGAARD S, JENSEN OA, PRAUSE JU. Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986; 224(4):355-360
23. HEEGAARD S. Structure of the human vitreoretinal border region. *Ophthalmologica* 1994;208(2):82-91

24. HEEGAARD S. Morphology of the vitreoretinal border region. *Acta Ophthalmol Scand Suppl.* 1997;(222):1-31
25. HEILSKOV TW, MASSICOTTE SJ, et al. Epiretinal macular membranes in eyes with attached posterior cortical vitreous. *Retina* 1996; 16(4):279-284
26. HERMEL MA, SCHRAGE NF. Efficacy of plasmin enzymes and chondroitinase ABC in creating posterior vitreous separation in the pig. A masked, placebo controlled in vivo study [ARVO 2001; Program Nr.: 2409]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(3):399-406
27. HIKICHI T, KADO M, YOSHIDA A. Intravitreal injection of Hyaluronidase cannot induce posterior vitreous detachment in a rabbit. *Retina* 2000; 20(2):195-198
28. HIKICHI T, YANAGIYA N, KADO M, et al. Posterior vitreous detachment induced by injection of plasmin and sulfur hexafluoride in the rabbit vitreous. *Retina* 1999; 19(1):55-58
29. JALKH A, TAKAHASHI M, TOPILOW HW, et al. Prognostic value of vitreous findings in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1982; 100(3):432-434
30. JOHNSON RN, GASS JDM. Idiopathic macular holes. Observations, stages of formation and implications for surgical intervention. *Ophthalmology* 1988; 95(7):917-24.
31. KADO M, TREMPE CL. Role of the vitreous in branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1988; 105(1):20-24
32. KAMPIK A, KENYON KR, et al. Epiretinal and vitreous Membranes: Comparative Study of 56 cases. *Arch Ophthalmol* 1981; 99(5 Suppl):1445-1454
33. KARAGEOZIAN HL, KARAGEOZIAN VK, ARVAN Y, et al. ACS-005 Hyaluronidase for intravitreal use: Evaluation of toxicity in an animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(4):662(3099-B789)
34. KELLY NE, WENDEL RT. Vitreous surgery for idiopathic macular holes: Results of a pilot study. *Arch Ophthalmol* 1991; 109(5):654-659

35. KOHNO T, SORGENTE N, et al. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28(3):506-514
36. LEWIS H, ABRAMS GW, BLUMENKRANZ MS, et al. Vitrectomy for diabetic macular traction and edema associated with posterior hyaloidal traction. *Ophthalmology* 1992; 99(5):753-759
37. LI X, SHI X, FAN J, et al. Posterior vitreous detachment with Plasmin in isolated human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002; 240(1):56-62
38. LIMB GA, DANIELS JT, PLEASS R, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 by glial Mueller cells: response to soluble and extracellular matrix-bound tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 2002; 160(5):1847-55
39. MARGHERIO RR, TRESE MT, MARGHERIO AR, et al. Surgical management of vitreomacular traction syndromes. *Ophthalmology* 1989; 96(9):1437-1445
40. MATSUMOTO B, BLANKS JC, RYAN SJ, et al. Topographic variations in the rabbit and primate internal limiting Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25(1):71-82
41. MATSUNAGA N, OZEKI H, et al. Histopathologic evaluation oft he internal limiting membrane surgically excised from eyes with diabetic makulopathy. *Retina* 2005(3); 25:311-316
42. OLIVEIRA LB, TATEBAYASHI M, MAHMOUD TH, et al. Dispace facilitates posterior vitreous detachment during vitrectomy in young pigs. *Retina* 2001; 21(4):324-331
43. PONSIOEN TL, VAN LUYN MJA, et al. Collagen distribution in the human vitreoretinal interface. *Invest Ophthalmol Vis Sic* 2008;49(9):4089-4095
44. SEBAG J. Pharmacologic vitreolysis [Editorial]. *Retina* 1998; 18(1):1-3
45. SEBAG J, BALAZS EA, et al. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30(8):1867-71
46. SIVAK JM, FINI ME. MMPs in the eye: Emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21(1):1-14

47. SMIDDY WE, MAGUIRE AM, GREEN WR, et al. Idiopathic epiretinal membranes. Ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. *Ophthalmology* 1989; 96(6):811-821
48. TEZEL TH, PRIORE LVD, KAPLAN HJ, et al. Posterior vitreous detachment with dispase. *Retina* 1998; 18(1):7-15
49. VALERIA CANTO SOLER M, GALLO JE, DOODS RA, et al. A mouse model of proliferative vitreoretinopathy induced by dispase. *Exp Eye Res* 2002; 75(5):491-504
50. VANDER JF, KLEINER R. A Method for induction of posterior vitreous detachment during vitrectomy. *Retina* 1992; 12(2):172-173
51. VERSTRAETEN TC, CHAPMAN C, HARTZER M, et al. Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 1993; 111(6):849-854
52. YOSHINO Y, IDETA H, NAGASAKI H, UEMURA A. Comparative study of clinical factors predisposing patients to proliferative vitreoretinopathy. *Retina* 1989; 9(2):97-100

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Gandorfer für die Überlassung der Arbeit und seine stets freundliche und kompetente Unterstützung ganz herzlich danken. Seine Anregungen und seine Begeisterung für das Thema haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Kampik, der diese Arbeit stets unterstützte.

Herzlichen Dank auch an Herrn Tielke für seine geduldige und unkomplizierte technische Einführung und Betreuung im Bereich der Rasterelektronenmikroskopie.

Auch gilt mein besonderer Dank Herrn Reinhard Tesch. Erst heute weiß ich es wirklich zu würdigen und zu schätzen, was ich durch ihn persönlich an Hilfe und Unterstützung erhalten habe.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken. Ihr habt mich auf meinem bisherigen Lebensweg unaufhörlich liebevoll unterstützt und ermutigt.

Vielen Dank!

München, 10.08.2009

Dominik Eckle